

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公表

⑬ 公表特許公報(A)

昭62-503171

⑭ 公表 昭和62年(1987)12月17日

⑮ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分)	3(2)
A 61 K 37/02 45/02 47/00	3 4 8	8615-4C 7252-4C G-6742-4C B-6742-4C				

(全 18 頁)

⑯ 発明の名称 ポリマー接合を利用する医薬組成物用蛋白質の可溶化

⑰ 特 願 昭61-503399

⑱ 翻訳文提出日 昭62(1987)2月26日

⑲ 出 願 昭61(1986)6月6日

⑳ 国際出願 PCT/US86/01252

㉑ 国際公開番号 WO87/00056

㉒ 国際公開日 昭62(1987)1月15日

優先権主張 ㉓ 1985年6月26日 ㉔ 米国(US) ㉕ 749955

⑳ 発 明 者 カトル, ナンディニ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94530, エル セリト, ジョー  
ダン アベニュー 6107

㉑ 発 明 者 ナウフ, ミツシエル ジェイ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94066, サンプルノ, ツラレ  
ドライブ 121

㉒ 出 願 人 シタス コーポレイション アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608, エミリービル, ファイフ  
ティサード ストリート 1400

㉓ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外 5 名

㉔ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB  
(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

請 求 の 範 囲

1. 非毒性で不活性な医薬として許容される水性キャリア媒体を含んで成る医薬組成物であって、該媒体中にβ-インターフェロン、インターロイキン-2及びイムノトキシンから成る群から選ばれた生物学的に活性な選択的に接合した蛋白質が溶解しており、該蛋白質はポリエチレングリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオールから成る群から選ばれた水溶性ポリマーに共有結合的に接合しており、該ホモポリマーは置換されていないか又は一端においてアルキル基により置換されておりそして該ポリオールは置換されておらず、そして前記蛋白質はその接合していない形において通常は疎水性でありそして可溶化剤の非存在下でpH6~8の前記水性キャリア媒体中に不溶性である、前記医薬組成物。
2. 前記ポリマーが約300~100,000の分子量を含有する、請求の範囲第1項に記載の組成物。
3. 前記ポリマーが、前記ポリマーのカルボン酸のN-ヒドロキシサクシニイミドエステル又は4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホネートエステルを介して蛋白質に接合する、請求の範囲第1項又は第2項に記載の組成物。
4. 前記ポリマーが非置換ポリエチレングリコールホモポリマー、モノメチルポリエチレングリコールホモポリマー、又はポリオキシエチル化グリセロールである、請求の範囲第1項~第3項のいずれか1項に記載の組成物。
5. 前記蛋白質がヒト由来の組換え蛋白質である請求の範囲第

1項~第4項のいずれか1項に記載の組成物。

6. 前記蛋白質がヒト由来の組換え蛋白質である請求の範囲第1項~第5項のいずれか1項に記載の組成物。

7. 前記蛋白質がミューテインである請求の範囲第1項~第6項のいずれか1項に記載の組成物。

8. 前記蛋白質がser<sub>1</sub> L-2、des-ala<sub>1</sub> L-2、des-ala<sub>1</sub> ser<sub>1</sub> L-2、des-ala<sub>1</sub> ala<sub>1</sub> ser<sub>1</sub> L-2、des-ala<sub>1</sub> ala<sub>1</sub> ser<sub>1</sub> L-2、ser<sub>1</sub> FN-β、又は組換えリシンA類とのイムノトキシンである、請求の範囲第1項~第7項のいずれか1項に記載の組成物。

9. 前記蛋白質が蛋白質上の1~10個のリジン残基を介して選択的に接合している、請求の範囲第1項~第8項のいずれか1項に記載の組成物。

10. 医薬組成物の製造方法であって、

(a) 少なくとも一端に反応性基を有する水溶性ポリマーを用意し、ここで該ポリマーはポリエチレングリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオールから成る群から選択されたものであり、該ホモポリマーは置換されていないか又は一端においてアルキル基により置換されており、そして該ポリオールは置換されておらず、

(b) β-インターフェロン、インターロイキン-2及びイムノトキシンから成る群から選ばれた生物学的に活性であり通常は疎水性であり、水に不溶性である蛋白質を前記ポリマーの反応性基と反応せしめることにより水溶性の生物学的に活性な選択的に接合した蛋白質を得；そして

(c) この蛋白質を非毒性で不活性な、医薬として許容される水性媒体中に配合する；  
ことを含んで成る方法。

#### ポリマー接合を利用する医薬組成物用蛋白質の可溶性

この発明は、生物学的に活性な蛋白質の化学的及び／又は生理学的性質を変化せしめる該蛋白質の化学的修飾に関する。さらに詳しくは、この発明は生理的pHにおいて蛋白質を可溶性にするための、ポリマーへの親脂性水不溶性蛋白質の選択的接合に関する。

微生物宿主細胞中で生産される多くの異種性蛋白質は屈折体中の不溶性物質として見出される。一般に見出される培養条件において屈折体を形成する異種性蛋白質の例にはインターロイキン2 (IL-2)、インターフェロン $\beta$  (IFN- $\beta$ )、ネコ白血病ウイルス (FeLV) 外皮蛋白質、ヒト成長ホルモン (hGH)、ウシ成長ホルモン (bGH)、ブタ成長ホルモン (pGH)、及びFMDウイルスのごときウイルスでコートされ又はこれらの融合した幾つかの蛋白質が含まれる。さらに、これらの蛋白質の多くは疎水性であり、そして溶液のままであるのではなく、物質及びそれ自体に付着しやすい (すなわち、凝集しやすい)。また、これら組織蛋白質の多くはグリコシル化されておらず、これらの天然対応物は水溶性のグリコシル化された分子である。その溶解性を変化せしめるであろうこれらの蛋白質の修飾は、これらの蛋白質の製造収量を上昇せしめ、そしてそれらの臨床的使用のための製剤化を容易にするために好ましいであろう。さらに、修飾は、

蛋白質が生体内に導入された場合に蛋白質の凝集を減少せしめ又は除去し、これによってその免疫原性を低下せしめるであろう。

特定の生理的反応を生じさせるための、循環系へのポリペプチドの使用は医学分野において良く知られている。ポリペプチドの臨床的使用に由来する潜在的な療法的利益に対する限界は、循環系において免疫反応を惹起するその能力である。この免疫反応は、R. Illing (1970), J. Clin. Endocrinol., 31, 679-688; W. Moore (1980), J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 20-27; 並びに W. Moore 及び P. Leppert (1980), J. Clin. Endocrinol. Metab., 51, 691-697 により記載されているように、注射に先立つ物質の凝集により惹起されるであろう。この反応は、ポリペプチドが注射された循環系による該ポリペプチドに対する抗体の生産を含む。この抗体生産は、時として循環系での持続時間を短縮する (半減期の短縮) ことにより、又は抗体-ポリペプチド相互作用によって分子を変形せしめることにより、該ポリペプチドの所望の生物学的機能を低下せしめ又は除去するであろう。

これらの潜在的に有用な療法的ポリペプチドを修飾して該ポリペプチドの所望の生理的活性を維持しながら免疫反応を排除し又は少なくとも減少せしめることにより、上記の欠点を伴わずに哺乳類の循環系中に該ポリペプチドを使用することが可能となるであろう。さらに、循環中のポリペプチドの延長された半減期のため、所望の療法的効果のために今まで可能であったよりも少量のポリペプチドが必要とされる

であろう。

前記の免疫原性の問題及び循環中の短い半減期の問題並びに幾つかの蛋白質の他の不所望の性質はよく認識されており、そしてこれらを解決するためにポリペプチドの種々の修飾が行われている。これらには、ポリエチレングリコール (PEG) 又はポリプロピレングリコール (PPG) のごとき實質的に直鎖のポリマーによる蛋白質の修飾が含まれる。例えば、米国特許 $\#$ 4,261,973 は、免疫原性アレルゲン分子とPEGのごとき非免疫原性水溶性ポリマーとの接合によるアレルゲンの免疫原性の減少を記載している。米国特許 $\#$ 4,301,144 はPEG, PPG、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、又はこれらのポリマーのエーテル、エステルもしくは脱水生成物へのヘモグロビンの接合によるヘモグロビン分子の酸素担持能力の増加を記載している。1984年1月11日に公開されたヨーロッパ特許出願公開 $\#$ 98,110は、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーへのポリペプチド又は糖蛋白質の接合がその生理的活性の長さを延長することを記載している。好ましくは、ポリペプチド又は糖蛋白質は水溶性の酵素又は天然インターフェロンである。米国特許 $\#$ 4,179,337 はPEG又はPPGへの酵素及びインシュリンのごとき水溶性ポリペプチドの接合により、その生理的活性の實質的部分を保持しながらポリペプチドの免疫原性を低下せしめることを開示している。米国特許 $\#$ 4,002,531 はアルデヒド誘導体を介してPEGに酵素を接合せしめる異なる方法を開示している。

米国特許№4,055,635 は、ポリサッカライドのごときポリマー基剤に共有結合した蛋白質分解酵素の水溶性複合体を含んで成る医薬組成物を開示している。

米国特許№3,960,830 はポリエチレングリコールのごときポリアルキレングリコールポリマーに結合したペプチドを開示している。

米国特許№4,088,538 は、ポリエチレングリコールのごとき有機ポリマーに共有結合した酵素を含んで成る可逆的に可溶性で酵素的に活性なポリマー酵素生成物を開示している。

米国特許№4,415,665 は、少なくとも1個の第1又は第2アミノ基、少なくとも1個のチオール基及び／又は少なくとも1個の芳香族ヒドロキシ基を含有する有機リガンド(第3カラム、第19～36行目に記載されている)を少なくとも1個のヒドロキシ基を有するポリマーキャリアー(第3カラム、第42～66行目に記載されている)に接合せしめる方法を開示している。

米国特許№4,495,285 は、カップリング剤を介してポリエチレングリコールにそのアミノ酸側鎖が連結されている非免疫原性プラスミノゲンアチベーターを開示している。

米国特許№4,412,989 は、アミド結合を介してポリエチレン又はポリプロピレングリコールに共有結合しているヘモグロビン又はその誘導体を含有する酸素担持材料を開示している。

米国特許№4,496,689 は、 $\alpha$ -1-プロテイナーゼインヒビターとPEG又はメトキシポリエチレングリコールのごとき

きポリマーとの共有結合で連結された複合体を開示している。

米国特許№3,619,371 は生物学的に活性な物質が化学的に結合しているポリマーマトリクスを開示している。

米国特許№3,788,948 は蛋白質をポリマーに結合せしめるための有機シアネート化合物の使用を開示している。

米国特許№3,876,501 は異化シアンにより水溶性炭水化物を活性化して酵素又は他の蛋白質へのその結合を改良することを開示している。

米国特許№4,055,635 はポリマー基剤に共有結合した蛋白質分解酵素の医薬組成物を開示している。

EP152,847 は酵素接合体、カルシウム塩及びポリエチレングリコールを含んで成る酵素接合体組成物を開示している。

1982年11月26日に公開されたJP 5792435はアミノ基のすべて又は一部分がポリエチレン成分により置換されている修飾されたポリペプチドを開示している。1973年9月27日に公開されたDE 2312615はヒドロキシ又はアミノ基を含有する化合物へのポリマーの接合を開示している。

EP 147,761は $\alpha$ -1-プロテイナーゼインヒビター及び水溶性ポリマー(このポリマーはポリエチレングリコールであることができる)の共有結合複合体を開示している。

米国特許№4,414,147 は、インターフェロンをポリ(エチレン無水コハク酸)のごときジカルボン酸の無水物に接合せしめることによりその疎水性を少なくすることを記載している。

これらの特許及び特許公表に加えて、幾つかの論文が、酵

素、1 g Gおよびアルブミンのごとき蛋白質の修飾剤として活性化PEG又はPPCを使用する概念を検討している。例えば、イナダ等、*Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **122**, 845-850(1984) は、PEGと接合せしめるためにシアヌル酸クロリドを使用することによってベンゼンのごとき有機溶剤に可溶性であるようにするために水溶性リボプロテインリパーゼを修飾することを開示している。Takahashi 等、*Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **121**, 261-265(1984) は、水溶性酵素をベンゼン中で活性で且つ可溶性である様にするためにPEGと共にシアヌル酸クロリドトリアジンをを用いてホースラディッシュパーオキシダーゼを修飾することを開示している。Suzuki等、*Biochem. Biophys. Acta.*, **788**, 248-255(1984) は、シアヌル酸クロリドで活性化されたPEGを用いる1 g Gの凝集の抑制を開示している。Abuchowski等、*Cancer Biochem. Biophys.*, **7**, 175-186(1984) は、サクシンイミジルサクシネートにより活性化されたPEGを用いるE. コリ(*E. Coli*)及びビブリオ・サクシノゲネス(*Vibrio succinogenes*)からのアスパラギナーゼの修飾が核蛋白質の半減期を延長しそして免疫原性を低下せしめることを述べている。Davis 等、*Biomedical Polymers* (ニューヨーク、アカデミックプレス、1980) p441-451 は、通常は不溶性である酵素がPEG付加により可溶化され得ることを開示しているが、これ以上の詳細は記載されていない。幾つかの他の論文は、サクシンイミジルサクシネート又はシアヌル酸クロリドにより活性化されたPEGによる酵素、例えばウリカーゼ、スト

レプトキナーゼ、カクラーゼ、アルギナーゼ及びアスパラギナーゼの修飾により核蛋白質の半減期を延長しそして免疫原性を減少せしめることを検討している。

しかしながら、これらの文献はいずれも、生理的pHにおいて疎水性でありそしてそれ故に水性媒体中での製剤化に抵抗する水溶性組織蛋白質に対してポリマー修飾法をいかに使用するかについての詳細は開示していない。従って、種々の蛋白質の薬理動態及び物理性の大きな差異のため、選択されたどの蛋白質がポリマーによる処理に好都合に反応するかを推定することは先験的に不可能である。さらに、いずれの文献も蛋白質の凝集、すなわち蛋白質が生体内に導入された場合に免疫反応を惹起する現象を低下せしめ又は排除することを開示していない。

1985年9月11日に公開された武田薬品のEP 154,316は、リンホカインの少なくとも1個のアミノ基に直接結合したPEGを含有する化学的に修飾されたリンホカイン、例えばIL-2を開示し、そしてクレームしている。

従ってこの発明は、 $\beta$ -インターフェロン、インターロイキン-2、及びイムノトキシンから選択される、周囲条件下で医薬として許容されるpH範囲において水中に通常不溶性である蛋白質を修飾してこれらをこの様な条件下で水性緩衝液中に溶解するようにすることを提供する。この修飾は蛋白質のグリコシル化を模倣し、これによって天然のグリコシル化蛋白質が可溶性であるのと同様に蛋白質を驚くほど可溶性にする。この修飾はまた、蛋白質を溶液状に維持するために洗

剤又は変性剤のごとき外来性可溶性添加剤の添加を回避する。修飾された蛋白質は、最初及び時間の経過後のいずれにおいても修飾されていない蛋白質の生物学的活性を保持する。

第2の利点として、ある条件下での修飾は、蛋白質の凝集を減少せしめもしくは排除することにより又は抗原決定基をマスクすることによって、蛋白質の生理的半減期を延長し、そしてその免疫原性を低下せしめるであろう。インビボ半減期は適切な条件及びポリマーを選択することにより調節することができる。

さらに詳しくは、この発明は、 $\beta$ -インターフェロン、インターロイキン-2及びイムノトキシンから成る群から選ばれた生物学的に活性な選択的に接合した蛋白質が溶解している、非毒性で不活性な医薬として許容される水性キャリア媒体を含んで成る医薬組成物に関し、この医薬組成物においては前記蛋白質がポリエチレングリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオールから成る群から選択された水性ポリマーに共有結合しており、ここで前記ホモポリマーは置換されていないか又は一端においてアルキル基により置換されており、そして前記ポリオールは置換されておらず、そして前記蛋白質はその未接合形においては通常は疎水性でありそして可溶化剤の非存在下pH6~8においては前記水性キャリア媒体に溶解しない。

好ましくは、前記ポリマーは非置換ポリエチレングリコール(PEG)、モノメチルPEG(mPEG)又はポリオキシエチル化グリセロール(POG)であり、そしてこのものは、

PEG、mPEG又はPOGカルボン酸の4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸エステル又はN-ヒドロキシサクシニミドエステルから形成されるアミド結合を介して前記蛋白質にカップリングする。

この発明の他の観点点は医薬組成物の製造方法に関し、この方法は：

(a) 少なくとも1個の末端反応性基を有する水性ポリマーを用意し、ここでこのポリマーはポリエチレングリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオールから成る群から選択されたものであり、ここで該ホモポリマーは置換されていないか又は一端においてアルキル基により置換されており、そして該ポリオールは置換されておらず；

(b)  $\beta$ -インターフェロン、インターロイキン-2及びイムノトキシンから成る群から選択された生物学的に活性で通常疎水性であり水不溶性である蛋白質を前記ポリマーの反応性基と反応せしめることにより水性であり生物学的に活性である選択的に接合した蛋白質を得；そして

(c) この蛋白質を非毒性であり不活性な医薬として許容される水性キャリア媒体中に配合する；ことを含んで成る。

第1図は、1L-2モル当り活性化されたPEG(PEG\*) 0、10、20、50及び100モルにおける反応から得られたPEG-修飾(PEG化)1L-2の分子量分析のための14% SDS-ポリアクリルアミドゲルのデンシトメーター分析スキャンを示す。

第2図は、2つの異なるpHにおける未修飾1L-2と比較したPEG化1L-2の溶解性を200~650nmの吸光スキャンにより示す。

第3図は、マウスに静脈内注射した後のPEG化1L-2及び未修飾1L-2の薬理動態(pharmacokinetics)を示す。

第4図はマウスに皮下注射した後のPEG化1L-2及び未修飾1L-2の薬理動態を示す。

第5図はIFN- $\beta$ モル当りPEG\* 0、10、20及び50モルにおける反応から得られたPEG化IFN- $\beta$ の分子量分析のための14%非還元SDS-ポリアクリルアミドゲルのデンシトメーター測定スキャンを示す。

第6図は2つの異なるpHにおける未修飾IFN- $\beta$ と比較したPEG化IFN- $\beta$ の溶解性を200~650nmの吸光スキャンにより示す。

この明細書において使用する場合、蛋白質を記載する“通常疎水性で水不溶性”なる語は、約6~8のpHすなわちおよそ中性の又は生理的pHにおける室温及び大気圧の周囲条件下で水又は水性媒体に不溶であるか又は難溶である蛋白質に関する。

この明細書において、修飾はそのような蛋白質がそのような生理的條件にかけられた場合にそれらの溶解性を増加せしめる様に作用する。この発明の目的のため、溶解度は(1)分光光度性により測定される濃度、(2)超遠心分離(ここでは、非常に大きな凝集体の沈降速度ではなくモノマー蛋白質の沈降速度が溶解度を示す)により測定されるS値、及び

(3) サイズ排除クロマトグラフィーにより測定される見かけの自然分子量(この場合、不溶性蛋白質よりも可溶性蛋白質がこの値に近い)により試験することができる。これらの試験のそれぞれについて、溶解度を示すであろう正確な数値は蛋白質がその中に配合される緩衝液のタイプ、緩衝液のpH、及び該緩衝液のイオン強度に依存するであろう。

この発明においてインターフェロン $\beta$ 及びインターロイキン-2は組織培養から又は組織浸出液により、そして任意の哺乳類、例えばマウス、ラット、ラビット、霊長類、ブタ、及びヒトから得ることができる。IFN- $\beta$ 、好ましくはヒトIFN- $\beta$ について命名される“組換 $\beta$ -インターフェロン”なる語は、天然IFN- $\beta$ に匹敵する生物学的活性を有する、従来技術において記載されている組換DNA技法により調製される線粒体細胞インターフェロンに関する。一般に、インターフェロンをコードする遺伝子はその天然プラスミドから切り出され、そしてクローニングのためのクローニングベクターに挿入され、そして次に発現ベクターに挿入され、これは宿主生物、好ましくは微生物、そして最も好ましくはE. コリを形質転換するために用いられる。この宿主生物はある条件下でインターフェロン遺伝子を発現せしめることによりIFN- $\beta$ を生産する。さらに好ましくは、IFN- $\beta$ は米国特許No. 4,588,585に記載されているようなミューテイン(mutein)であり、このミューテインにおいては野生型又は天然分子の17位に通常存在するシステインがセリン又はアラニンのごとき中性アミノ酸により置き換えられている。最

も好ましくは、IFN- $\beta$ ミューテインはIFN- $\beta$ ser17である。

IL-2、好ましくはヒトIL-2について命名される“組換えインターロイキン-2”なる語は、天然IL-2に匹敵する生物学的活性を有し、例えばタニグチ等、*Nature*, 302: 305-310 (1983) 及び Devos, *Nucleic Acids Research*, 11: 4307-4323 (1983) により記載されている組換えDNA技法により調製されるインターロイキン-2に関する。一般に、IL-2をコードする遺伝子はその天然プラスミドから切り出され、そしてクローン化するためのクローニングベクターに挿入され、そして次に発現ベクターに挿入され、このものは宿主生物、好ましくは微生物、そして特に好ましくはE. コリを形質転換するために使用される。この宿主は発現条件下で外来遺伝子を発現せしめることによりIL-2を生産する。

さらに好ましくは、IL-2は米国特許第4,518,584に記載されている様なミューテインであり、このミューテインにおいては野性型又は天然分子の125位に通常存在するシステインがセリン又はアラニンのごとき中性アミノ酸により置き換えられている。これに代って又はこれと組合せて、IL-2ミューテインは野性型又は天然分子の104位に通常存在するメチオニンがアラニンのごとき中性アミノ酸により置き換えられているものである。

好ましくは、IL-2は、天然ヒトIL-2のアミノ酸配列のジスルフィド結合を天然ヒトIL-2のアミノ酸配列に少なくとも実質的に同一のアミノ酸配列を有しそして天然ヒ

トIL-2と共通の生物学的活性を有する蛋白質をコードするIL-2のヒトcDNA配列により形質転換された微生物又は酵母により生産される蛋白質である。アミノ酸配列の実質的同一とは、同一であるか又は合成蛋白質と天然ヒトIL-2との間の不都合な機能的相違を惹起しない1個又はそれより多くのアミノ酸の変更(除去、付加、置換)により異なる配列を意味する。この様な性質を有するIL-2蛋白質の例にはタニグチ等、前掲; Devos、前掲; ヨーロッパ出願公開第51,539及び第88,195; 米国特許第4,518,584、前掲に記載されているものが含まれる。最も好ましくはIL-2はser<sub>125</sub> IL-2、des-ala<sub>104</sub>ser<sub>125</sub> IL-2、des-ala<sub>104</sub> IL-2、des-ala<sub>104</sub>ser<sub>125</sub> IL-2、又はdes-ala<sub>104</sub>ser<sub>125</sub> IL-2であり、ここで“des-ala<sub>104</sub>”はIL-2のN-末端アラニン残基が除去されていることを示す。

本発明の蛋白質の正確な化学構造は多数の因子に依存するであろう。分子中にイオン化可能なアミノ基及びカルボキシル基が存在すれば、特定の蛋白質は酸性塩もしくは塩基性塩として又は中性の形で得られるであろう。適切な環境条件下に置かれた場合にそれらの生物活性を保持しているこれらのすべての調製物は本発明の蛋白質の定義に含まれる。さらに、蛋白質の一次アミノ酸配列は糖成分を用いる誘導体化(グリコシル化)により、又は他の補完的分子、例えばリピド、リン脂質、アセチル基等により、そしてより一般的にサッカライドとの接合により付加され得る。この様な付加の幾つかの観点からは生産宿主の翻訳後プロセッシング系を介して達成され、

他のこの様な変形はインビトロで誘導されるであろう。ともかく、この様な変形は、蛋白質の生物活性が破壊されない限り本発明の定義に含まれる。言うまでもなく、この様な変形は、種々のアッセイにおいて蛋白質の活性を増強し又は低下せしめることにより量的又は質的に生物活性に影響を与えることができる。

しばしば、組換えDNAを含有する形質転換された宿主細胞から生産されたIL-2及びIFN- $\beta$ のごとき疎水性組換え蛋白質は、細胞培養媒体中に溶解するのではなく、細胞内に沈着する。細胞内に生産された蛋白質は、精製された生物学的に活性な材料に調製される前に、細胞破片から分離されそして細胞から回収されなければならない。この様な屈折体を単離するための方法においては、形質転換された宿主微生物の細胞膜が破壊され、この破壊物から99重量%以上の塩が除去され、脱塩された破壊物が再破壊され、この破壊物に物質、例えば糖、例えばシュークロースが添加され、破壊物内の液中に密度又は粘度の勾配が形成され、そして高速遠心分離すなわち約10,000~40,000xgにより屈折体が細胞破片から分離される。好ましくは、ダイアフィルトレーション又は遠心分離により破壊物から塩が除去され、そして液の密度を約1.1~1.3 g/mlに上昇せしめるためにシュークロースが添加される。

遠心分離段階の後、屈折体を含有するペレットを酸性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムにより可溶化し、生成した懸濁液を遠心し、そして蛋白質を含有する上清を処理して蛋白

質を単離する。蛋白質は適切な手段、例えば逆相高圧液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)及び/又はゲル透過クロマトグラフィーにより上清から分離される。この様な分離の後、好ましくは蛋白質を酸化して、その天然対応物に最も類似する配置にある組換え蛋白質の高収量の生産を保証する。この様な酸化はZ. Shaked等の米国特許第4,530,787に記載されている。酸化はまた、K. Koths等の米国特許第4,572,798に記載されている様に、可溶化された形の蛋白質を含有する水溶液を約5.5~9のpHにおいて、空気存在下で、Cu<sup>++</sup>陽イオンを含有する少なくとも有効量の酸化促進剤と反応せしめることにより行うこともできる。好ましい酸化促進剤又は酸化剤はCuCl<sub>2</sub>又は(o-フェナンスロリン)<sub>2</sub>Cu<sup>++</sup>である。酸化の後、蛋白質を場合によっては脱塩し、そしてRP-HPLC、稀釈/ダイアフィルトレーション、S-200ゲル透過クロマトグラフィー、及び限外濾過技法によりさらに脱塩及び精製した後に、後に記載する様に活性化ポリマーにより修飾する。この修飾を行う時点は最終医薬製剤及び用途のために要求される蛋白質の最終純度に依存するであろう。

この明細書において蛋白質の第3のクラスに適用するためを使用する場合、“イムノトキシン”なる語は、抗体と細胞毒性成分との接合体に関する。イムノトキシンの細胞毒性成分は細胞毒性剤、細菌又は植物由来の酵素的に活性な毒素、あるいはこの様な毒素の酵素的に活性な断片(“A鎖”)を包含する。酵素的に活性な毒素及びその断片の例にはジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合断片、エキソトキシンA

類(シュードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)から)、リシンA類、アブリン(abrin)A類、モデツシン(modectin)A類、 $\alpha$ -サルシン、アロイリテス・ホルデー(*Aleuritis fordii*)蛋白質、ジアンチン(dianthin)蛋白質、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)蛋白質(PAPI、PAPII、及びPAP-III)モノルディカ・カランテア(*Conordia charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、グロチン(crocin)、サボナリア・オフィシナリス(*Saponaria officinalis*)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、及びエノマイシン(enomycin)が含まれる。リシンA類、ジフテリア毒素の非活性断片、アブリンA類、及びPAPIIが好ましい。ポリマーとの反応により修飾されるリシンA類が最も好ましい。

イムノトキシンにおいて使用される抗体は好ましくは、特定の疾患状態、例えば癌、例えば乳癌、前立腺癌、直腸癌又は卵巣癌、黒色腫、骨髄腫等に対して向けられたモノクローナル抗体である。

抗体と細胞毒性成分との接合体は種々の2官能性蛋白質修飾剤を用いて行うことができる。この様な試薬の例にはN-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、イミノチオレート(IT)、イミドエステル、2官能誘導体、例えばジメチルアジビミデート・HCl、活性エステル、例えばジサクシニミジルスベレート、アルデ-

ヒド、例えばグルタルアルデヒド、ビス・アジド化合物、例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン、ビス-ジアゾニウム誘導体、例えばビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン、ジイソシアネート、例えばトリレン-2,6-ジイソシアネート、及びビス-活性弗素化合物、例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンが含まれる。

この明細書において蛋白質に適用するために使用する場合、"選択的に接合した"なる語は、主として反応条件、最終用途、ポリマーの分子量、及び使用される特定の蛋白質に依存して、蛋白質の1個又は複数個のアミノ酸残基を介して共有結合した蛋白質に関する。この残基は蛋白質上の任意の反応性アミノ酸、例えば1個もしくは2個のシステイン又はN-末端アミノ酸であることができるが、好ましくは反応性アミノ酸はリジンであってその遊離- $\alpha$ アミノ基を介して活性化されたポリマーの反応性基に連結され、又はグルタミン酸もしくはアスパラギン酸であってアミド結合を介してポリマーに連結される。

蛋白質の1つの好ましい態様においては、蛋白質の1個又は2個のアミノ酸残基、好ましくは最大生物活性のためリジンを介して共有結合される。他の好ましい態様においては、蛋白質は、蛋白質の循環寿命を一般に増加せしめる高度な置換を伴って、蛋白質の10個までのアミノ酸残基、好ましくはリジンを介して共有結合される。

この発明の方法に従えば、通常は疎水性でありそして水不

溶性である上記の3つのタイプの蛋白質は、可溶化剤を使用することなく、特定のポリマーへの接合により蛋白質を修飾することにより、好ましくは約5~8、さらに好ましくは約6~8、そして最も好ましくは6.5~7.8のpHにおいて水性キャリア媒体中に可溶化される。蛋白質がそのリジン残基を介して反応する場合、反応のpHは好ましくは約7~9、さらに好ましくは8~9である。これらの蛋白質のこのような修飾の成功は、従来の水溶性酵素及びホルモンのポリマー修飾の使用から予想することができない。

蛋白質が付加されるポリマーはポリエチレングリコール(PEG)のホモポリマー又はポリオキシエチル化ポリオールであり、すべての場合においてポリマーが室温において水溶性であることが条件となる。ポリオキシエチル化ポリオールの例には、例えば、ポリオキシエチル化グリセロール、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース等が含まれる。

ポリオキシエチル化グリセロールのグリセロール骨格は、例えば動物及びヒトにおいてモノ-、ジ-トリ-グリセライドとして天然に存在するのと同じ骨格である。従って、この分枝は体内における外来物質として必然的に見られることはないであろう。

ポリマーはある特定の分子量を有することを必要としないが、しかし、例えば使用される特定の蛋白質に依存して、分子量が約300~100,000、さらに好ましくは350~40,000の範囲であることが好ましい。

好ましくは、PEGホモポリマーは置換されていないが、しかしそれは一端においてアルキル基により置換されているもよい。好ましくは、このアルキル基はC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、そして最も好ましくはメチル基である。最も好ましくは、ポリマーはPEGの非置換ホモポリマー、PEGのモノメチル置換ホモポリマー、又はポリオキシエチル化グリセロールであり、約350~40,000の分子量を有する。

蛋白質はポリマー上の末端活性基を介して接合される。活性基を有するポリマーを、この明細書において活性化されたポリマー(又は活性化ポリマー)と称する。活性基は蛋白質上の遊離アミノ基又は他の反応性基と反応する。しかしながら、最適の結果を得るために選択される反応性基のタイプ及び量並びに使用されるポリマーのタイプは、該反応性基が蛋白質上の多過ぎる特に活性な基と反応するのを回避するために、使用される蛋白質に依存するであろう。これを完全に回避することが不可能な場合、蛋白質の濃度に依存して蛋白質モル当り一般に約0.1~1000モル、好ましくは2~200モルの活性化されたポリマーを使用することが推奨される。特に1L-2の場合、使用される活性化されたポリマーの量は1L-2のモル当り50モル以下であり、そして最も好ましくは、最終的に所望される特定の性質に依存して1L-2のモル当り約2~20モルである。すなわち、最終量は、最適活性を維持し、同時に可能であれば蛋白質の半減期を最適化する均衡である。好ましくは、蛋白質の生物活性の約50%が維持され、そして最も好ましくは100%が維持される。

共有結合修飾反応は、不活性ポリマーを用いて反応性の生物学的に活性な材料のために一般に使用される任意の適当な方法により、蛋白質上の反応性基がリジン基である場合には好ましくは約pH 5～9において、行うことができる。一般に、この方法は、活性化されたポリマー（少なくとも1個の末端ヒドロキシ基を有する）を調製し、そしてその後で蛋白質を活性化されたポリマーと反応せしめることにより配合に過する可溶化された蛋白質を生成せしめることを含む。

上記の修飾反応は、1又は複数の段階を含む幾つかの方法により行うことができる。一般階反応において活性化されたポリマーを生成せしめるために使用することができる適切な修飾剤の例にはシアヌル酸クロリド（2, 4, 6-トリクロロ-S-トリアジン）及びシアヌル酸フルオリドが含まれる。

好ましい態様において、修飾反応は2段階において行われ、この場合まずポリマーを酸無水物、例えば無水コハク酸、又は無水グルタル酸と反応せしめることによりカルボン酸を形成せしめ、そして次にこのカルボン酸を該カルボン酸と反応することができる化合物と反応せしめることにより蛋白質と反応することができる反応性エステル基を有する活性化されたポリマーを形成せしめる。この様な化合物の例にはN-ヒドロキシサクシニミド、4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸等が含まれ、そして好ましくはN-ヒドロキシサクシニミド又は4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸が使用される。例えば、モノメチル置換されたPEGは上昇した温度、好ましくは約100～110℃にて4時

間、無水グルタル酸と反応せしめることができる。次に、こうして生成したモノメチルPEG-グルタル酸を、カルボジイミド試薬、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド又はイソプロピルカルボジイミドの存在下でN-ヒドロキシサクシニミドと反応せしめることにより活性化されたポリマー、メトキシポリエチレン-グリコリル-N-サクシニミジルグルタレートを生合成せしめる。これは次に蛋白質と反応することができる。この方法は、Abuchowski等、*Cancer Biochem. Biophys.*, 7, 175-186(1984)に詳細に記載されている。他の例において、モノメチル置換されたPEGを無水グルタル酸と反応せしめ、次にジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下で4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸(HNSA)と反応せしめることにより活性化されたポリマーを生成せしめることができる。HNSAは、Bhatnagar 等、*Peptides: Synthesis, Structure-Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium*, Rich等(編集)(ピーエスエムカル社、ロックホード I L, 1981) 97-100頁、並びにNitecki等、*High-Technology Route to Virus Vaccines* (米国微生物学会: 1986) "Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and Its Application,"に開示されている。

エステル結合はアミド結合に比べて化学的及び生理学的に安定でないため、エステルの同時の生成を伴わないでカルボン酸又はアミドを生成する接合反応中化学的転換を用いるのが好ましいであろう。

こうして修飾された蛋白質は次に非毒性の不活性な医薬として許容される水性キャリアー媒体中に、好ましくは約3～8、さらに好ましくは5～8のpHにおいて配合する。インビトロでの適用のため、例えば診断目的で使用されるイムノトキシンのため、適用及び製剤化の態様は臨界的ではない。培養又はかん液媒体と相溶性の水性製剤が一般に使用されるであろう。療法のためにインビボで使用される場合、無菌生成物は、混合物が再溶解された場合に医薬として許容されるpHをもたす量の水性緩衝液中に溶解した蛋白質混合物から成るであろう。この媒体には場合によってはマンニトールのごとき水溶性キャリアーが添加されるであろう。現在製剤化されている未修飾IL-2は4℃において少なくとも6ヶ月間安定である。

製剤中の蛋白質の薬量レベルは前臨床試験において得られるインビボ効力データに依存し、そして主として使用される蛋白質及び最終用途に依存するであろう。

製剤を凍結乾燥する場合、この凍結乾燥混合物は、バイアル中に常用の非経口水性注剤、例えば蒸留水を注入することにより再溶解せしめることができる。

上記の態にして調製された再溶解された製剤は、ヒト又は他の動物に、これらに治療をもたらすのに薬法的に効果的な量（すなわち患者の疾患状態を除去又は緩和せしめる量）において非経口投与するために適当であり、療法タイプは蛋白質のタイプに依存する。例えば、IL-2療法は種々の免疫調節症状、例えばT細胞変異誘発、細胞毒性T細胞の誘

導、ナチュラルキラー細胞活性の増強、IFN- $\gamma$ の誘導、細胞性免疫の回復又は増強（例えば、免疫不全症状の治療）、及び細胞性抗腫瘍活性の増強のために適当である。

IL-2の直接投与に代えて、IL-2は用いられる免疫原において、単離されリンホカイン-活性化されたリンパ球と一緒に、医薬として許容されるキャリアー中で投与することができ、この場合リンパ球は腫瘍を有するヒトにIL-2と共に投与された場合腫瘍と反応する。この方法は、S. Rosenberg等、*New England Journal of Medicine* (1985), 313: 1485-1492により十分に記載されている。

IFN- $\beta$ 療法は抗癌、抗ウイルス及び抗乾癬治療のために適当である。IFN- $\beta$ なんらかの効果を示す特定の病にはリンパ腫、骨髄腫、ヘアリー細胞白血病、並びに性病及びライノウイルスを含む幾つかのウイルス性疾患が含まれる。

イムノトキシ療法は、それに対する標的抗体が有効である疾患、通常は癌に対して適当である。特に、イムノトキシンは乳癌のごとき癌に向けられる。

イムノトキシンの投与量及び使用方法は、例えば薬剤の薬理動態、癌の種類及びその集団、ポリマーのタイプ及び長さ、特定のイムノトキシンの性質、例えばその療法係数、患者、並びに患者の病歴に依存するであろう。IL-2及びIFN- $\beta$ の投与量及び使用方法は同様に例えば薬剤の薬理動態、疾患の種類、IL-2又はIFN- $\beta$ の性質、患者、及び患者の病歴に依存するであろう。例えば、異なる修飾されたIL-2蛋白質は、異なる投与経路のために有利な異なる薬理動態的

及び原法的性質を有すると予想される。長期に作用する薬剤は3~4日ごと、1週間~2週間ごとに1回投与すれば足りるであろう。クリアランス速度は、例えば付加するポリマーのタイプ及びポリマーのサイズを変えることによって、患者の特定の要求に合致するように最終的柔軟性を与えることによって変更することができる。

この発明をさらに説明する次の例において、特にことわらない限りすべての部及び%は重量により、すべての温度は度により示す。

#### 例 I

PEG化されたインターフェロン-2 (IL-2) の調製  
A. PEG-エステルの調製

商業的に入手可能なモノメチルPEG-5000をまず100℃~110℃にて4時間にわたりグルタルアルデヒドと反応せしめることにより、又はAbuchowski等、Cancer Biochem. Biophys., 1, 175-186 (1984) の方法と同様の方法により、分子量5000のPEGの線状のモノメチル置換されたエステルを得ることができる。生ずるPEG-グルタレートは、Abuchowski等、前掲、176頁に詳細に記載されている様にして、ジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下でN-ヒドロキシサクシニイミドと反応せしめる。生ずる生成物はメトキシポリエチレングリコールN-サクシニイミジルグルタレートであり、以後PEG\*と称する。

同様にして、無水コハク酸をモノメチルPEG-5000と反応せしめ、そして生ずるPEG-サクシネートをN-ヒドロ

キシサクシニイミドと反応せしめた。生ずる生成物はメトキシポリエチレングリコールN-サクシニイミジルサクシネートである。

他の段階において、そして類似の方法により、N-ヒドロキシサクシニイミドの代りにHNSAを使用してPEGカルボン酸エステル-HNSAを調製した。このエステルの調製はBhatnagar等、前掲、及びNilecki等、前掲に記載されている。PEGカルボン酸エステル-HNSAはこの例及び後続の例に記載する方法において活性化されたPEGとして使用することができる。

B. IL-2へのPEG\*の接合

この例のため、米国特許№4,518,584及び4,530,787(前掲)に記載されている様にして調製された、RP-HPLC精製された組換え-des-alanyl,ser,ss IL-2(125位のシステインがセリンにより置き換えられており、そしてN-末端アラニン残基が除去されている)、又は前記の製造方法からのダイアフィルトレーション後のdes-alanyl,ser,ss IL-2を用いた。1mlの緩衝液(磷酸ナトリウム、pH9:0.1% SDS)中0.5mgのこの精製されたIL-2に、IL-2モル当り0.25, 5, 10, 20, 50及び100モルのPEG\*のモル比で、新しく調製した水性PEG\*を添加した。十分に混合した後、この溶液を室温(23℃)にて30分間攪拌した。各反応混合物をセファデックスG-25カラム) フォルマシアに適用して低分子量種からIL-2及びPEG-IL-2を分離した。セファデックスG-25カラムはSDSを含有しない10mM

磷酸ナトリウム(pH9)中で使用し、そして蛋白質からSDSのほとんどを除去するためにも役立てた。ほとんどの未修飾のIL-2及びSDSは、混合床イオン阻止樹脂(ビオラFAG114B)に反応混合物を添加することによっても除去した。PEG化IL-2サンプル中の残留SDSのレベルは、R.Sokoloff及びR.Frigon, Anal. Biochem., 118, 138-141 (1981)により記載されたアクリジン-オレンジ試験により測定した場合、蛋白質mg当り3~7mgのSDSであった。

C. 修飾されたIL-2の精製

疎水性交換クロマトグラフィー(ビオラド:バイオゲル-フェニル-5-PW)を用いて、精製されたPEG化IL-2を得た。減少する濃度を用いる直線状グラジェント(溶剤Aは50mMリン酸ナトリウム(pH7)中1.7M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>である;15分間で100-0%のA)は、PEG化IL-2と未修飾IL-2の良好な分離をもたらした。溶剤Bへの10%エタノールの添加、及び水浴中でのカラムの保持がそれぞれ、PEG化IL-2の回収及び分離を顕著に増強した。百分のアリコートを、Gillis, S. 等、J. Immunol., 120, 2027-2032 (1978)に一般に記載されている方法により、IL-2の生物活性(細胞増殖)についてアッセイした。

#### 例 II

PEG化IL-2の特徴付け

A. 種々のPEG\*対IL-2のモル比を用いる反応からの修飾されたIL-2生成物のサイズの特徴付け  
IL-2モル当り0.10, 20, 50又は100モルのPEG\*

を含む、例I. A.に記載した反応からの生成物のSDS-PAGE(14%)は、PEG\*とIL-2のモル比の増加と共に修飾の程度が増加することを示した。第1図に示す様に、島津2波長スキャナを用いて、種々のゲルレーンのデンストメーター-スキャンを得た。10PEG\*/IL-2サンプル、及び20PEG\*/IL-2サンプルは、少量の未修飾IL-2のほかに約25kdの見かけ分子量を有する明確な1種を示した。50PEG\*/IL-2及び100PEG\*/IL-2においては、高分子量領域に、極度にPEG化された蛋白質に特徴的な汚れ(smear)が存在し、そして未修飾IL-2は存在しなかった。

TSK-250カラム(ビオラド;25×0.4cm、PBS中)上でのPEG-IL-2溶液のサイズ排除は、PEG\*対IL-2の比率の増加に伴い修飾が増加するという他の証明を与えた。

B. 修飾の程度と関数としてのPEG化IL-2の生物活性

IL-2のモル当り0.25, 5, 10, 20, 50及び100モルのPEG\*を含有するIL-2PEG化反応の前記のバイオゲル-フェニルカラムからの画分を、例I. C.に記載したIL-2細胞増殖バイオアッセイによりアッセイした。結果を第1表に増加的に示す。より多くのアミノ基が修飾されるに従って、IL-2の不活性化は徐々に増加した。100PEG\*/IL-2のモル比で行われた反応において、修飾されたIL-2生成物の比活性は未修飾IL-2のその約10%に有意に低下した。



第 1 表

修飾の程度の関数としての PEG 化 IL-2 の生物活性

IL-2 のモル当り最初に加えられた PEG-エステルのモル	生物活性 (BRMP 標準ユニット/μg IL-2)
1. 0 PEG*/IL-2	$7.36 \pm 4.83 \times 10^4$
2. 2.5 PEG*/IL-2	$9.20 \pm 3.45 \times 10^4$
3. 5 PEG*/IL-2	$11.50 \pm 2.30 \times 10^4$
4. 10 PEG*/IL-2	$10.35 \pm 4.37 \times 10^4$
5. 20 PEG*/IL-2	$7.82 \pm 2.76 \times 10^4$
6. 50 PEG*/IL-2	$3.45 \pm 2.30 \times 10^4$
7. 100 PEG*/IL-2	$0.69 \pm 0.23 \times 10^4$

\*これらの数値は IL-2 バイオアッセイにおける大きな変動を反映している。

C. 未修飾 IL-2 と比較した PEG 化 IL-2 の溶解度修飾反応、及びこれに続く SDS の除去をもたらすセファックス G-25 クロマトグラフィーの後、PEG 化 IL-2 の pH を 6.5 ~ 7 に低下せしめた。低 SDS 中での未修飾 IL-2 は pH 5 ~ 7 において沈降した。第 1 表中の PEG\*/IL-2 の量について低分子比において行われた反応からの修飾された IL-2 は、AG11A8 樹脂又はビオゲルフェニル (HPLC) クロマトグラフィーによりその後除去され得る未修飾の IL-2 のために、いくらかの濁りを有していた。PEG\*/IL-2 の高分子比からの修飾された IL-2 の溶液は長時間透明なままであった。pH 調整された溶液を極速心分

性 (ナチュラルキラー活性; 米国特許 No. 4,518,584 に記載されている)、及び LAK 活性 (リンホカイン-活性化キラー活性; Grien 等, *J. Exp. Med.*, 155, 1823-41 (1982) に記載されている) は未修飾 IL-2 のそれらと同一であった。未修飾 IL-2 に対して 2.0 倍過剰の遊離 PEG (4 K グルトン) の添加は NK 又は LAK 活性に影響を与えなかった。

D. pH の関数としての PEG 化 IL-2 の安定性  
IL-2 のモル当り 50 モルの PEG\* を用いる修飾反応からの PEG 化 IL-2 を、種々の pH で、室温にて 3 時間インキュベートし、そして次に 1.4% SDS-PAGE により IL-2 ポリペプチドからのアミド結合 PEG の加水分解について測定した。PEG 化 IL-2 を、0.1% のトリフルオロ酢酸を含有する 10% アセトニトリル (pH 2.5) 中に 3 倍に稀釈し、そしてさらに pH 7.5, 10, 及び 11 にてインキュベートした。アルカリ性 pH は pH 9 の磷酸塩緩衝液に NaOH を添加することにより達成された。これらの条件下で pH 11 より低い pH において加水分解の証拠は得られなかった。しかしながら、pH 11 において PEG 化 IL-2 は加水分解に感受性であった。室温 (20~23°C) にて 3 時間にわたり PEG 化 IL-2 が安定であるという観察は、類似の条件下で行われる RP-HPLC 段階を含む IL-2 回収方法を記載する、1986 年 2 月 11 日に与えられた米国特許 No. 4,569,790 の観点から特に有用である。

解 (50,000rpm, SW60 ローター, 5°C にて 12 時間) した。上清を取り出し、そして貯蔵した。SDS-PAGE による残量及び上清の両者のアリコートの分析は、残渣が未修飾 IL-2 であり、他方上清が PEG 化 IL-2 を含有することを示した。SDS 又は他の変性剤の不存在下中性 pH の水性媒体中での PEG 化 IL-2 及び未修飾 IL-2 の溶解度の劇的な差は第 2 図の吸光スキャン (Hewlett-Packard 8450A スペクトロフォトメーター) により示される。特徴的スペクトルの喪失により示される様に、未修飾 IL-2 は pH 7 において溶液から沈降する。

精製された PEG 化 IL-2 (HPLC-フェニルカラムの後) は、洗剤又は変性剤を含まない水性緩衝液中に pH 7 において完全に可溶性であった。精製された PEG 化 IL-2 は、試験された期間 (少なくとも 5 ヶ月間) にわたり溶液のままであり、そしてその生物活性を維持した。SDS を伴わないで中性 pH において可溶性であった PEG 化 IL-2 は、0.1% の SDS の存在下での未修飾の IL-2 に比較して次の比活性を有していた。

IL-2 のモル当り最初に加えた PEG* のモル	比 活 性 (BRMP 標準ユニット/μg IL-2)
0	$7.36 \times 10^4$
10	$12.88 \times 10^4$
20	$8.51 \times 10^4$

10 PEG\*/IL-2 及び 20 PEG\*/IL-2 の NK 活

E. マウスにおいて未修飾 IL-2 と比較した PEG 化 IL-2 の薬理動態

## 1. 静脈内投与

未修飾 IL-2 及び PEG 化 IL-2 の 2 種類の調製物の薬理動態データを、合計 35 匹のマウスにおいて各マウスに D5W (水中 5% デキストロース) 中 12.5 μg の蛋白質の静脈内投与の後を得た。注射のために使用したサンプル (100 μl ボルス) は下に示す通りであり、そして下記の活性を有していた。

サ ャ プ ル	IL-2 活性 (BRMP 標準ユニット/μg IL-2)
A. 未修飾 IL-2 (ロット LP-263)	$5.98 \pm 0.46 \times 10^4$
B. PEG 化 IL-2 (10 モル PEG*/1 モル IL-2 の反応から)	$12.19 \pm 4.14 \times 10^4$
C. PEG 化 IL-2 (50 モル PEG*/1 モル IL-2 の反応から)	$4.37 \pm 0.23 \times 10^4$

サンプル A は、最終濃度 0.1% の SDS を含有する D5W 中での注射により材料が凝集しない様にされた。PEG 化 IL-2 サンプル (B 及び C) には SDS を含めなかった。これらは通常の水性条件下で凝集することなく完全に溶解したからである。

12 匹の雌性 Balb/C マウスの 3 群の各マウスに、3 種類のサンプルの 1 つを尾静脈に注射し、そして 1.5 分間目にすべての動物から眼窩後から採血した。注射の後種々の時間に 100 μl の血液サンプルを眼窩後からヘパリン処理した毛細

管に取り出した。遠心分離 (1分間) によりすぐに血漿を調製し、そしてアリコートを用い、C. に記載したバイオアッセイのためのアッセイ媒体中に希釈した。第3図は未修飾IL-2及びPEG化IL-2サンプルの2つの調製物の薬理動態を示す。第3図からの、IL-2の最初の分布の半減期 (50%生物活性) は次の通りである。

サ ン プ ル	t <sub>1/2</sub>
A. 未修飾IL-2	2分
B. PEG化IL-2 (10PEG*/IL-2)	10分
C. PEG化IL-2 (50PEG*/IL-2)	35分

すなわち、10PEG\*/IL-2を用いるIL-2のPEG化は、細胞増殖アッセイにより測定した場合、マウスにおける循環半減期の5倍の延長をもたらす、そして50PEG\*/IL-2を用いる場合、循環半減期の一層劇的な17倍の延長をもたらす。

未修飾IL-2、PEG化IL-2 (10モルPEG\*/モルIL-2の反応から)、及びPEG化IL-2 (50モルPEG\*/モルIL-2の反応から) を、IL-2のタイプ当り12匹のマウスに静脈内注射した場合、IL-2の注射された合計ユニットに対する1.5分間目に回収された生物活性の%は次に示す通りである。

サンプル当り2~5匹のマウスを用いた。第4図は、マウスへの皮下注射の後の未修飾IL-2及びPEG化IL-2の薬理動態を示す。下に示す様に、注射された全IL-2活性の最大%がPEG化分子について非常に高く血漿中に見出されるのみならず、PEG化IL-2のクリアランス速度は有意に低下した (第4図を参照のこと)。

サ ン プ ル	血漿中に見出されるIL-2生物活性の最大%
A. 未修飾	0.5
B. PEG化IL-2 (20PEG*/IL-2)	7.0
C. PEG化IL-2 (50PEG*/IL-2)	17.5

F. PEG化IL-2及び未修飾IL-2の注射の後のラビットにおける免疫反応

この研究では、各群4頭のラビットからなる3群を用いた。

A群は、前記の製造方法からの、未修飾の、ダイアフィルトレーション後のdes-alanyl,ser,ss IL-2 (ロットLP 304) を注射されたラビットであった。B群は、上記の様に20倍過剰のPEG\*を用いてロットLP 304から調製したPEG/IL-2を注射されたラビットであった。C群は、50倍過剰のPEG\*を用いてやはりLP 304から調製したPEG/IL-2を注射されたラビットであった。各IL-2調製物は注射の前に無菌水で希釈した。

雄性ニュージランド白色ラビット (体重約2.5kg) のそれぞれに、部位当り0.5ml (1~2×10<sup>3</sup> ユニットの相当

サ ン プ ル	IL-2生物活性の回収 (%)
A. 未修飾IL-2	57
B. PEG修飾IL-2 (10PEG*/IL-2)	72
C. PEG修飾IL-2 (50PEG*/IL-2)	100

これらの結果は、PEG\*による修飾の程度によるIL-2生物活性の回収の%の劇的な増加を示し、IL-2のモル当り50モルのPEG\*の修飾レベルにおいて100%の回収が生ずる。

## 2. 皮下投与

無菌水中12.5mgの蛋白質を48匹のマウスに皮下投与した後に未修飾IL-2及びPEG化IL-2の薬理動態的データを得た。マウスにおいて肩甲骨皮下注射に使用されたサンプル (1個の100μlボルス) は未修飾IL-2、PEG化IL-2 (20モルPEG\*/モルIL-2反応からの)、及びPEG化IL-2 (50モルPEG\*/モルIL-2反応からの) を含有した。3種類すべてのサンプルは0.125mg/mlであった。未修飾IL-2サンプルは、中性pHの水溶性溶液中に不溶性であるため、0.1%のSDSを含有した。

種々の時点において、100μlのサンプルを阻凝後よりヘパリン処理したチューブに前記の様に取出し、血漿を調製し、そしてバイオアッセイのためにアリコートを取った。45分間の時点では3種類のサンプルのそれぞれについて16匹のマウスを用いた。他のすべての時点においては、サ

するIL-2又はPEG化IL-2を2部位において筋肉内注射した。

種々の時間間隔において、すべてのラビットの耳縁の静脈又は耳の中央の動脈から採血した。血液を凝固せしめ、そして遠心して血清を得た。血清のアリコートをIL-2アッセイ媒体中に5倍に希釈し、そして例I. C. の細胞増殖アッセイによりバイオアッセイした。筋肉内注射後の循環血中のIL-2及びPEG化IL-2の薬理動態プロフィールはマウスについて得られたそれに類似していた。

上記の注射の後1週間目に、すべてのラビットに、該当するIL-2又はPEG化IL-2を用いて第2シリーズの筋肉内注射を行った。

最初の注射の後3週間目に、すべてのラビットに該当する未修飾IL-2又はPEG化IL-2を1~2×10<sup>4</sup> ユニット/kgで追加した。探検試薬としてホースラディッシュパーオキシダーゼが連結されたヤギ抗ラビットIgGを用いそして基質としてオルトフェニレンジアミンを用いるELISAアッセイにより、規則間隔で血清 (上記の様に得られた) 中で抗原特異的抗体反応を測定した。492nmにおける吸光を測定した。ダイナテック・ラボラトリーズ社から得られるポリスチレン及びポリビニルの2つのタイプのELISAプレート上に抗原をコートした。血清に対して試験した抗原は未修飾IL-2 (LP 304)、PEG/IL-2 (20倍過剰PEG\*) 及びPEG/IL-2 (50倍過剰PEG\*) であった。最初の注射の後5週間目の結果は次の通りであった。

**A群** これらのラビットはすべて、ELISAにおいて $10^{-4}$ ～ $10^{-5}$ への稀釈において見られるIL-2特異的IgMを生じさせていた。4ラビットの内の2頭(A3及びA4)はまた、 $10^{-4}$ 稀釈まで高いIL-2特異的IgGを有していた。ラビットA2はわずかに低いレベルのIgGを有していた。ラビットA1は最低のIL-2特異的IgGを有していた。

**B群** これらのラビットは検出し得るIL-2特異的IgGを生じさせなかった。すべてが、ELISAアッセイにおいて $10^{-4}$ 稀釈まで検出されるIL-2特異的IgMを有していた。これらのアッセイを、ELISAプレート上の抗原としてPEG/IL-2を用いて反復し、同じ結果が得られた。

**C群** これらのラビットは検出し得るIL-2特異的IgGを有しなかった。すべてが、抗原としてPEG/IL-2を用いて行われたELISAアッセイにおいて $10^{-4}$ 稀釈まで検出されるIL-2特異的IgMを有していた。

これらの研究は、PEG/IL-2が抗原である場合に抗原特異的IgG反応が低下し、他方未修飾IL-2を用いる場合、抗原特異的IgGが時間と共に出現することを示している。

G. Balb/c マウスにおけるMethAを用いるPEG化IL-2の効果の検討

マウスに毎日投与するこの実験においては、未修飾のIL-2がわずかしき効果を示さない投与量においてMethA肉腫に対して非常に効果的であった。

56頭のBalb/c マウスのそれぞれに、スローン・ケッ

8日目において、配合されたIL-2により処理されたマウスは64%の腫瘍増殖阻害を示した。しかしながら、9日目までに阻害は40%に過ぎず、そして腫瘍は急速に成長した。これらの群は苦痛を除去するために殺した。PEG\*/IL-2で処理されたマウスは8日目及び9日目の両方において94%の腫瘍の増殖阻害を示した。これらのマウスもまた苦痛を除去するために殺した。

#### 例 Ⅱ

分子量350のPEGによるPEG化IL-2の調製

A. PEG-エステル調製

分子量350のPEGの線状モノメチル置換エステルを次の方法により得た。

アルドリッチ・ケミカル社製の合計10gのモノメチルPEG350を110℃に加熱した。これに14.3gの無水コハク酸(アルドリッチ)を加えた。この混合物を110℃にて一夜攪拌し、そして次に冷却した。ベンゼンを添加し、そしてベンゼン溶液を濾過した。試薬を濾液から単離した。

得られたPEG-350-サクシネート2gを25mlのジメチルホルムアミド、3.531gのジクロロヘキシルカルボジイミド、及び例Ⅰに記載した様にして調製した6.914gのHNSAと混合した。この混合物を室温にて48時間暗中で攪拌し、そして濾過した。この濾液に1gのエーテルを徐々に添加して試薬を沈降せしめた。合計150mgの粗混合物を1mlの水に加え、遠心し、そしてデカントした。上清を水中セファデックスG-25カラムに適用し、そして適切な画分をプールし、そ

リングから得られる $6 \times 10^5$ のメタコランセン-A(MethA-cholanthrene-A)(MethA) マウス線維肉腫セルラインをBalb/c マウス中の腹水からの細胞懸濁液として、首の背部に皮下注射した。マウスを同様な数の大形、中形及び小形の腫瘍(5～100mm)を有する3群に分けた。次に、3群に試験物質を腹腔内注射した。A群には0.01mg/mlのPEG(モノメチル5000)を含有する0.5mlのPBSを与えた。B群には10%のウシ血清+IL-2に対して20倍過剰のPEG\*を用いて得られた3mgのPEG\*/IL-2を含有する組織培養培地0.5mlを与えた。C群には10%のウシ血清+前記の未修飾のダイアフィльтраーション後の3mgのdes-ala-ser,ss IL-2を含有する組織培養培地を与えた。

3群に7日間にわたり毎日注射した。4日目にマウスの重量を測定し、そしてそれらの腫瘍の体積を測定した。

8日目には、3群の体重が異なっていた。

PEG対照	26.0g
PEG*/IL-2	21.1g
IL-2	23.6g

	0日	6日	8日	9日
	腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )	腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )	腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )	腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )
A群(PEG対照 実験)	138 ± 48	3259 ± 919	5597 ± 1877	7333 ± 1403
B群(PEG/IL-2)	129 ± 42	424 ± 129	341 ± 218	353 ± 148
C群(IL-2)	130 ± 63	2523 ± 808	2034 ± 997	4405 ± 1471

して凍結乾燥した。得られる精製された生成物を今後PEG\*と称する。

B. IL-2へのPEG\*の接合

この例のために、米国特許№4,518,584及び№4,572,798(前掲)に記載されている様にして調製されたdes-ala-ser,ss IL-2を使用した。1.0mlの緩衝液(0.1M磷酸ナトリウム、pH9、0.1% SDS)中0.4mgのこの精製されたIL-2に、1モルのIL-2当り10モルのPEG\*のモル比で、新しく調製された水性PEG\*を加えた。十分に混合した後、この溶液を32℃にて15分間、1時間、5時間及び20時間攪拌した。各時点において125mlの溶液を取り出し、そして40mlの1mg/ml ε-NH<sub>2</sub>-カプロン酸に加え、そして4℃にて貯蔵した。

C. PEG化IL-2の特徴付け

反応Bからの生成物のSDS-PAGE(14%、還元)分析は、15分間までに実質的な量の修飾が生じたことを示した。

例Ⅰ、C.において前記したIL-2細胞増殖バイオアッセイによりインビトロで試験した場合、PEG-350 IL-2は活性であった。

D. マウスにおいて未修飾IL-2と比較したPEG化IL-2の取運動態

例Ⅱ、E.において前記したのと同様にして、取運動態分析のため、PEG-350 IL-2、及び未修飾IL-2をマウスに静脈内注射した。結果を第Ⅱ表に示す。

第 II 表

PEG化IL-2 (PEG-350 IL-2) の変形動態

時 間	PRNP標本ユニット* / 回収%	
	未修飾IL-2	IL-2 PEG
0分 (注射された全ユニット)	176,913	80,045
1.5分	81,880/ 46.3	25,035/ 31.3
8分	9602/ 5.43	3158/ 3.94
20分	4950/ 2.80	2772/ 3.46
45分	1178/ 0.67	564/ 0.70
1時間	212(2)**/ 0.12	129/ 0.16
2時間	46(2)**/ 0.03	0
3時間	0	0

\* これらの値はマウスにおけるユニット (BRNPユニット×20倍率) である。

\*\* カッコはその群中に4匹より少数のマウスがいる場合を示す。

## 例 IV

分子量400及び1000のPEGを用いるPEG化IL-2の調製

分子量400及び1000の線状ジヒドロキシ (非置換) PEGのIL-2誘導体を、それぞれ非置換PEG-400及びPE

IFN- $\beta$ の分離は、0.1% SDSを含む50mM酢酸ナトリウム (pH5) 中セファクリルS-200カラムを用いる分子排除クロマトグラフィーを用いて達成することができる。S-200 両分からのアリコート、W.E. Stewart, "The Interferon System", Springer Verlag, 17-18頁 (1978) により一般的に記されている細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) アッセイを用いてIFN- $\beta$ 抗ウイルス活性についてアッセイし、そして例VIに記述する様に活性であることが見出された。CPEアッセイは、インターフェロンがそれにより処理された細胞をウイルスの効果から保護するという原理に基づいて機能する。ウイルスに対してより耐性である細胞は生存し、他方ウイルスに対して感受性である細胞は細胞変性効果を経験し、そして死ぬであろう。

## 例 V

PEG-5000により修飾されたPEG化IFN- $\beta$ の特徴付け

A. 種々のPEG\* 対IFN- $\beta$ モル比の反応からの修飾されたIFN- $\beta$ 生成物のサイズの特徴付け

1分子のIFN- $\beta$ 当り0.10, 20又は50分子のPEG\*を含む例VIに記述した反応からの生成物のSDS-PAGE (14%, 非還元剤)、IL-2の場合の様に、PEG\* 対IFN- $\beta$ のモル比の増加に伴う修飾の程度の増加を示す。デンストメータースキャン (第5図) は、PEG\* 対IFN- $\beta$ のモル比の増加に伴う20,000の分子量で動く未変性IFN- $\beta$ の量の減少を示す。30~35,000の見かけ分子量を有する明瞭

G-1000を用いて例VIに記述した方法を一般的に使用して調製した。

## 例 V

分子量10,000, 20,000及び35,000のPEGによるPEG化IL-2の調製

分子量10,000の線状モノメチル置換PEGのIL-2誘導体を、ユニオンカーバイド製PEG10,000を用いて例I.A.に記述した方法に一般的に従って調製した。分子量20,000及び35,000のジヒドロキシPEGのIL-2誘導体を、フルカ製のPEG-20,000及びPEG-35,000を用いて、例I.A.において言及したAbuchowski等 (前掲) に類似する方法 (上昇した温度ではなく室温において溶剤中で塩基を使用する) に従って得た。得られる変形されたIL-2蛋白質は前記の細胞増殖アッセイによりアッセイした場合生物活性であった。

## 例 VI

PEG-5000を用いるPEG化インターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) の調製

活性化されたPEG-エステル調製、及び米国特許No. 4,518,584に記述されている様な17位のシステイン残基がセリン残基によって置き換えられているRP-HPLC精製された組換IFN- $\beta$  (ser, IFN- $\beta$ ) への前記活性化されたPEG-エステルの接合を、1モルのIFN- $\beta$ 当り0.10, 20又は50モルのPEG\*を含む反応において、例I.A.及びI.B.においてIL-2について記述したのと本質的に同じ方法により行った。未修飾IFN- $\beta$ からのPEG化

な1種が試験された3種類すべての分子比 (10PEG\*/IFN- $\beta$ , 20PEG\*/IFN- $\beta$ , 及び50PEG\*/IFN- $\beta$ ) のPEG修飾の後に存在した。おそらく一層高度に修飾されたIFN- $\beta$ 種を代表する一層高分子量の種の増加が1分子のIFN- $\beta$ 当り50分子のPEG\*で行われた反応において明らかであった。

B. 未修飾IFN- $\beta$ に比較したPEG化IFN- $\beta$ の生物活性

1モルのIFN- $\beta$ 当り0.10, 20又は50モルのPEG\*を含有するPEG化反応のS-200分離の両分を例IIIに記述されている様にして抗ウイルス活性についてアッセイした。3種類すべての修飾反応から得られたPEG化IFN- $\beta$ の生物活性は第III表に示す様に未修飾IFN- $\beta$ に匹敵した。

第 III 表

CPEアッセイにより測定した場合の未修飾IFN- $\beta$ 及びPEG化IFN- $\beta$ の生物活性

IFN- $\beta$ モル当り 最初に添加したPEG* のモル数	生物活性 (ユニット/μl)
0	$2.2 \pm 0.6 \times 10^4$
10	$2.2 \pm 1.6 \times 10^4$
20	$2.0 \pm 0.1 \times 10^4$
50	$4.1 \pm 0.8 \times 10^4$

### C. 未修飾IFN- $\beta$ に比較したPEG化IFN- $\beta$ の溶解性

修飾反応及びS-200 百分の後、PEG化IFN- $\beta$ 及び未修飾IFN- $\beta$ のすべてをそれぞれpH7に調整し、例1に記載したのと同様にしてセフデックスG-25クロマトグラフィーを用いてSDSを除去した。200~650nmの吸光スキャンにより示される様にPEG化IFN- $\beta$ は溶液状に維持されたが、未修飾IFN- $\beta$ はpH7において溶液から沈殿した(第7図)。修飾されたIFN- $\beta$ 及び未修飾IFN- $\beta$ の両者はpH9において可溶性であった。試験されたすべてのPEG化IFN- $\beta$ サンプルについて同様の結果が得られた。

### D. 未修飾IFN- $\beta$ に比較したPEG化IFNの薬理動態

PEG化IFN- $\beta$ を用いた場合未修飾IFN- $\beta$ に対して、ラット及びマウスにおいて、IL-2のそれと同様にインビボ半減期が改善された。

#### 例 2

##### PEG化リシンAの調製及び特徴付け

##### A. PEG化リシンAの調製

精製にかけるため及び細胞毒性を示すために可溶化を必要としない可溶性の組換えリシンAを下記の方法に従って調製した。リーダー配列がリーダー/リシンAキメラのN-末端部分である様に仮定的融合ペプチドを形成するためにリシンAのコード配列がphoAのリーダー配列をコードするDNAと直接リーディングフレーム内に置かれた場合、この様に配置さ

れたリシンA配列は可溶性の細胞毒性物質をもたらす。

pRT 3(1986年3月7日に寄託されたATCC寄託No.63,027)、pRT17(1986年3月7日に寄託されたATCC寄託No.67,026)、及びpRT32(1986年3月7日に寄託されたATCC寄託No.67,025)中に含まれる前駆体蛋白質のための遺伝子を含有する発現ベクター又はこれらの変異形を造成した。これらの発現ベクターによる宿主細胞の形質転換がコードされた前駆体蛋白質の可溶化をもたらした。arg-arg変形された前駆体をトリプシンにより開裂せしめ、ここに記載する様に前駆体のA部分及びB部分を別個の蛋白質として製造した。

phoA発現系において、必須成分は、リシンAコード配列の上流にあり、ここに近位にありそしてフレームが合っていない(リシンAコード配列はATGコドンにより開始される)停止されたphoAリーダー配列である。言うまでもなく、2つのコード配列は完全な細菌プロモーターを備えていなければならず、これはリーダーにすでに結合しているphoAプロモーターであった。さらに、B. チューリンジエンシス(*B. thuringiensis*)の結晶蛋白質と関連する正のレトロレギュレーター配列である正のレトロレギュレーター配列の存在により生産が改良された。これはレプリコン及び選択マーカーを含む細菌性輸送ベクター上に置かれた。

次に、これらのベクターを使用して適当な原核性宿主を形質転換し、この宿主を、選択された特定の宿主のために適切な条件下で、最もしばしば、発現系の制御のもとに置かれたプロモーターが制御される条件下で増殖せしめる。次に、選

択されたプロモーターの制御のもとで発現を行う条件を与えることによってリシンAの生産を誘導し、そして生成物の所望の蓄積が得られるのに十分な時間にわたって生産を進行せしめた。次に、細胞を破壊することにより蛋白質生成物を単離し、そして細胞破片を除去した。次に自由に溶解する蛋白質に適用されるものとして当業界において知られている標準的技法を用いて、生産された蛋白質をさらに精製した。しかしながら、抽出及び精製の効率、部分精製された抽出物をフェニルセファロースで処理することにより増強された。音波処理物中のリシンA(膜又は他の結合物から一旦分離されたもの)の溶解度は、音波処理物を高速の100,000gにて30分間遠心分離して不溶性蛋白質を回転は降せしめた場合になお上清に残るその能力により示した。

合計2mlのこの可溶性リシンA(9.0mg/ml)を、2mlの新鮮な $\beta$ -メルカプトエタノールを加え(0.1%)そして室温にて一夜インキュベートすることにより還元した。2mlの還元されたリシンAを、0.10M NaPO<sub>4</sub>(pH8.0)で平衡化されたG-25カラム(ファルマシア)に適用し、次に0.5mlの緩衝液によりサンプル適用容量を2.5mlとした。次の3.0mlの溶出液(緩衝液を適用した)を脱塩されたリシンAとして集めた。

1.0mlの脱塩されたリシンA(約6mg)を1.5mlのマイクロフュージチューブに移した。このリシンAに、例1. A.において記載したようにして得られたポリエチレングリコール2000のN-ヒドロキシサクシニイミドエステル(活性化され

たPEG)4.5mgを加えた。4.5mgの活性化されたPEGはリシンAに対して1:1倍過剰量の活性化されたPEGを意味した。

活性化されたPEGを、おだやかに混合することによりリシンA溶液に溶解した。種々の時点において、反応混合物の100 $\mu$ lのアリコートを次の方法によりG-25カラム上で脱塩して未反応の活性化PEGを除去しそしてPEG化反応を停止せしめた。

100mlのPEG/リシンAを適用し、

2.4mlの0.10M NaPO<sub>4</sub>(pH8.0)を適用し、

1.1mlの0.10M NaPO<sub>4</sub>(pH8.0)を適用し、

そして、溶出液を脱塩されたリシンAとして集める。

採用した時点は、10分、20分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、及び5時間であった。

反応混合物は0時から永上に維持した。

PEG化の程度を決定するために1.5%ミニゲルを流した。その結果、PEG化は良好に行われそして反応は急速に生ずる様であった。

PEG化リシンAの新サンプルを抗体への接合のために調製した。約40mgの上記のリシンAを、1%の $\beta$ -メルカプトエタノールを含有する約1.0mlのTris緩衝液(pH8.5)と混合した。これを約5mlに濃縮し、そして2本のG-25カラム上EDTA緩衝液中で脱塩して6.37mlの前溶出液を得た。PEG(約2000)のN-ヒドロキシサクシニイミドエステル合計24.6mgをリシンAに加え、そしてこの混合物を永上で

15分間反応せしめた。(これは、10倍過剰の活性化されたPEGに相当する。)

PEG化リシンAを3本のG-25カラム上で脱塩し9.70 mlの最終溶出液容量を得た。β-メルカプトエタノールを5 ml (約0.05%) に添加した。PEG化リシンA混合物を4℃にて貯蔵した。

合計50 μgのPEG化リシンA混合物を分取用Zorbax GF-250 サイズ分離カラム(デュボン)に、1 ml/分の流速で、50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、50 mM NaPH<sub>4</sub> (pH 5.5) の緩衝液を用いて注入した。

分取用分画の5 ml分画の13.5%ミニゲル処理により決定した場合、最初のピークはPEG化リシンAであった。

最初の試行において得られたプールを約2 mlに濃縮し、そして次に280nmの吸光をモニターすることによりZorbax GF-250 カラム上でのHPLCにより精製した。各試行の画分15~23をPEG化リシンAとしてプールした。

次に、PEG化リシンAの分子量を、前記の精製方法に類似する条件下でHPLCにおいて分子量標準(ビオラッド)を移動せしめることにより決定した。線形回帰を行い、PEG化リシンが約2.2 K (1量体)、4.4 K (2量体)、及び5.9 K (多量体)の見かけ分子量を有することが示された。

#### B. PEG化リシンAの特徴付け

Zorbax GF-250 で処理した2 μgのPEG化リシンAからのアリコート、プロメガ・プロテック (Promega Biotec) 製のキットを用いて、網状赤血球アッセイ (翻訳) における生

を室温にて5, 5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) と反応せしめ、そして次に冷却し、そして次に抗体分子当たり2.5の1 T分子を与えるのに十分な2-イミノチオラン (1 T) を加えた。

合計166 μlのプロピレングリコールを0.84 mlの1 T-誘導体化抗体に加えた。2.32 mlの上記のPEG化リシンAを加えて接合反応を開始した。混合物を室温にて2時間インキュベートした。

接合反応混合物を、Zorbax-GF-250 サイズ分画 (ゲル濾過) HPLCカラムに適用し、0.15 M NaPO<sub>4</sub> (pH 8.0) の溶出緩衝液を用いた。カラムからの精製された免疫接合体の合計78%の回収が得られた。

#### D. 接合体の特徴付け

##### 1. リボゾーム翻訳アッセイ

接合体プールを無菌フードのもとで無菌チューブ中に濾過除菌し、このチューブからアリコートを種々の無菌マイクロフュージチューブに無菌的にピペット輸送した。最終無菌化イムノトキシンの100 μlのアリコートを、ラビット網状赤血球からの精製された抽出物、<sup>35</sup>S-メチオニン、mRNA及びmRNA合成のための他の要素と共にインキュベートした。リボゾーム翻訳の阻害剤を伴わないで、及び伴ってアッセイを行った。投与量応答曲線は蛋白質合成を測定する。対照サンプルは非PEG化イムノトキシン、リシンA鎖、及びPEG化リシンA鎖を包含した。結果は次の通りであった。

物活性について試験した。与えられたサンプルは画分28 (高分子量)、34 (2量体)、40 (単量体)、及び幾つかの未精製PEG化リシンA/未修飾リシンA混合物であった。ラビット網状赤血球細胞翻訳アッセイは、放射性メチオニンの取り込みにより蛋白質合成を測定する。

第IV表に示される結果は、精製された単量体のみが遊離リシンAのそれに接近する阻害を示すことを示した。2量体及び多量体画分は50%における阻害投与量 (ID50) の上昇により測定した場合、非常に低下した阻害を示した。

第 IV 表

材料	ID50 (ng/ml)	ID50 (M)
リシンA	0.16	$5.2 \times 10^{-12}$
高分子量	158.5	$5.2 \times 10^{-7}$
2量体	5011.9	-
単量体	3.16	$103.6 \times 10^{-12}$

すなわち、リシンをPEG化して単量体のみを生成せしめ、そして混合物から多量体を除去する必要があるようである。

PEG化の溶解性の利点は観察された。すなわち、PEG化リシンAの20 μg/mlへの濃縮の達成はPEG化されていないリシンAを用いては不可能であった。

#### C. 抗体へのPEG化リシンAの接合

520C9 と称する乳癌モノクローナル抗体は1985年1月8日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビル、MD にNcH88596として寄託されている。この抗体

試 験 材 料	ID50 (リシンA鎖に基くM数)
リシンA鎖	$5.9 \times 10^{-12}$
PEG化リシンA鎖	$52.0 \times 10^{-12}$
リシンA鎖と520C9との接合体	$60.8 \times 10^{-12}$
PEG化リシンA鎖と520C9との接合体	$141.0 \times 10^{-12}$

このアッセイは、PEG化接合体及び非PEG化接合体のID50がそれぞれ15.85 及び7.94 ng/mlであることを示した。このアッセイの精度はおおよそ±100%より良くはないため、両者の阻害は同じである。リシンA鎖への抗体のみの付加は非接合リシンAに比べてID50を減少せしめる機である。すなわち、PEG化は抗体の付加以上にリシンA活性を害しない。トキシンのみのPEG化ではなくイムノトキシンのPEG化が結果を改良すると予想される。

#### 2. インビボ細胞毒性アッセイ

1 mlの培地中4000個の乳癌細胞 (公衆が入手可能なセルラインSKBR3 から) を、1 セットの8 mlガラスバイアルに加え、次にPEG化接合体稀釈物及び非PEG化接合体稀釈物 (100 μg/mlのウシ血清アルブミン (BSA) を含有するリン酸緩衝塩溶液 (PBS) 中) を加えた。37℃にて22時間インキュベートした後、培地を吸引除去し、単層をPBSで洗浄し、そしてメチオニン不含有培地に<sup>35</sup>S-メチオニンを添加したものを加えた。バイアルを37℃にて2時間さらにインキュベートし、培地を除去し、そして細胞を1 μg/

mlのメチオニンを含む10%のトリクロロ酢酸2mlにより2回洗浄した。細胞を乾燥し、シンチレーション液体を加え、そしてシンチレーションカウンター中で放射能を測定した。細胞毒性を、対照（未処理）の蛋白質合成の50%（TCID50%）をもたらず接合体の組織培養阻害投与量として表現した。

アッセイの結果は次の通りであった。

接合体	TCID50% (nH)
非PEG化	0.216
PEG化	<0.422

このアッセイの精度もまた約±100%より良好ではなく、そしてそれ由に両者のTCID値は同一である。細胞毒性の観点から、律速段階はリシンA類活性を含むのではなく、他の事象、最も高い可能性として接合体結合、トランスロケーション、及び/又は細胞内移動を含むであろう。

#### 例 IX

ポリオキシエチル化グリセロール（POG）により修飾されたIL-2の調製及び特徴付け

##### A. 活性POG-IL-2の調製

分子量5000のポリオキシエチル化グリセロール（POG）はポリサイエンス（Polysciences）により注間合成されたものである。10gのPOGに2.28gの無水グルタル酸（POGに対して10倍過剰）を加えた。この混合物を110

でにて2時間攪拌しそして冷却した。これを20mlのCHCl<sub>3</sub>に溶解し、そして激しく攪拌しながら500mlのエーテル中に徐々に注いだ。生成物を蒸め、エーテルですすいで約90%のPOG-グルタレート生成物を得た。この生成物を、例I. A. に記載したようにしてN-ヒドロキシサクシニミドと反応せしめることにより活性エステルであるPOG-グルタリルN-ヒドロキシサクシニミド（POG\*）を得た。次に、例I. B. に記載した様に、0.1M硫酸ナトリウム（pH 9）、0.1M SDS中0.25mg/ml-2の溶液20mlを5mgのPOG\*と室温にて30分間反応せしめた。

10mlの反応混合物を2mlに濃縮し、そして10mM硫酸ナトリウム（pH 9）中セファデックスG-25カラムに適用した。これをpH 7に調整し（溶解）そして濃縮した。2mlの濃縮物に1.7M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、50mMリン酸ナトリウム（pH 7）から成る溶剤を加えた。次に、これを0でにてフェニール-TSKカラムに適用した。画分のSDS-PAGE（14%、還元）は良好な分離を示した。

他の10mlのPOG-IL-2をpH 5に調整した後に3mlに濃縮した。これをセファクリルS-200カラムに適用した。画分のSDS-PAGE（14%、還元）は均一なPOG-IL-2生成物を示した。

##### B. POG-IL-2の特徴付け

反応混合物のS-200分離からの画分を例I. C. に記載した様にして生物活性についてアッセイした。結果を第V表に示す。

第 V 表

サンプル	生物活性 (BRMP 標準ユニット/μg IL-2)
未修飾 IL-2 (平均)	1.2 × 10 <sup>4</sup>
最大量の POG-IL-2 を含む 2 個のプールされた画分 (平均)	1.5 × 10 <sup>4</sup>

#### 寄託

リシンA類を調製するために使用されたプラスミド及び抗体520C9を生産するハイブリドーマは、アメリカン・タイプカルチャー・コレクション（ATCC）、12301 パークラウンドライプ、ロックビル、メリーランド、20852-1776、米国、に寄託された。寄託されたサンプルのATCC受託番号及び寄託日は次の通りである。

ベクター/ハイブリドーマの名称	寄託日	受託番号
520C9	1/8/85	BB 8696
pRT3	3/7/86	67.027
pRT17	3/7/86	67.026
pRT38	3/7/86	67.025

上記の寄託はATCCとこの特許出願の承継人であるシクス・コーポレーションとの間の契約に基づいて行われた。ATCCとの契約は、これらのプラスミド及びセルラインの子孫の永久的な入手可能性を公衆に対して、該寄託又は公表を記載しそして特定している米国特許が発せられた後、又は米国もしくは外

国の特許出願が公衆に公表された後に、どちらが先に到来するかにかかわらずと、そして、これらのプラスミド及びセルラインの子孫の入手可能性を、米国特許商標局長官により35 USC § 122 及びこれに基づく長官規則（88606638への特別の言及を伴う 37 CFR § 1.14を含む）に従って定められた者に与える。この特許出願の承継人は、寄託中のプラスミド及びセルラインが適切な条件下で培養された場合に死滅し、失われ又は破壊された場合には、通知の後これらが同じプラスミド及びセルラインの生存培養物によりすみやかに置き換えられることに同意する。

要約すれば、この発明は、PEGホモポリマー又はポリオキシエチル化ポリオールに選択的に接合されそしてそれによって生理的pHにおける水性媒体中に可溶化されているか又は一層可能性にされている生物学的に活性な特定の蛋白質がこのような媒体中に溶解している医薬組成物を提供するものと見られる。接合は、通常疎水性である水不溶性の蛋白質をpH 6~8の水に可溶性にするために役立つのみならず、その生理的半減期を延長し、そして通常疎水性である蛋白質の凝集を減少せしめもしくは除去することにより又は抗原決定基をシールすることによりその免疫原性を低下せしめる。接合を伴わない場合、蛋白質は洗剤又は変性剤のごとき可溶化剤の添加により、安定剤の添加と組合わせてpHを上げることにより、あるいはpHを下げるにより溶解されなければならない。

以上の記載は、当業者がこの発明を実施するのに十分であ

ると考えられる。寄託された具体例はこの発明の1つの観点の単なる例示であると考えられ、そして機能的に同等なすべてのプラスミド及びセルラインはこの発明の範囲に属することが意図されるから、この発明は寄託されたプラスミド及びセルラインの範囲に限定されない。この発明における材料の寄託は、この明細書の記載が、最良の形態を含むこの発明のすべての観点の実施を可能にするのに不適當であるとの自白を構成するものではなく、これらは請求の範囲をそれらが示す特定の例示に限定するものとして理解されるものでもない。

FIG. 1

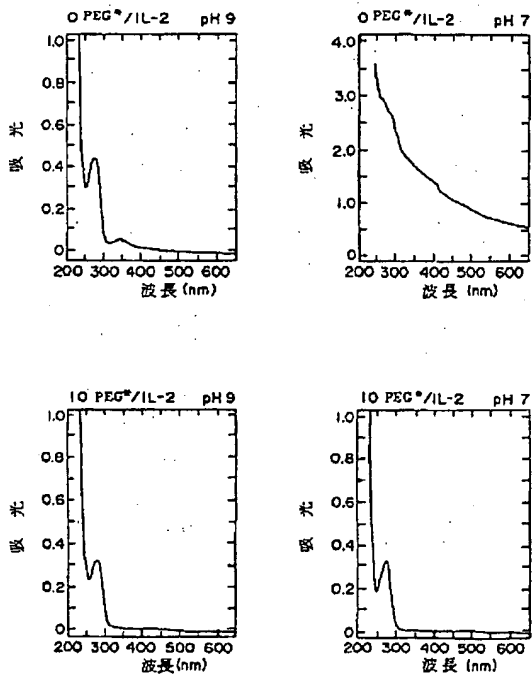
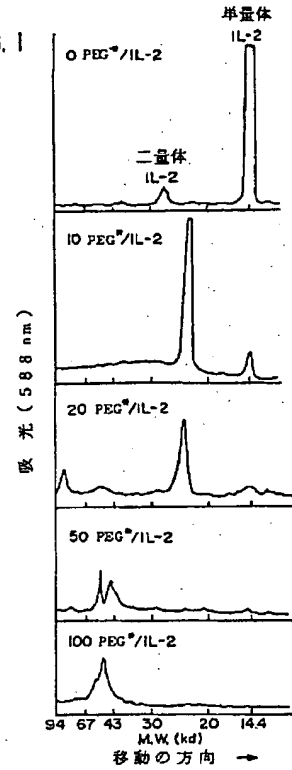


FIG. 2

FIG. 3

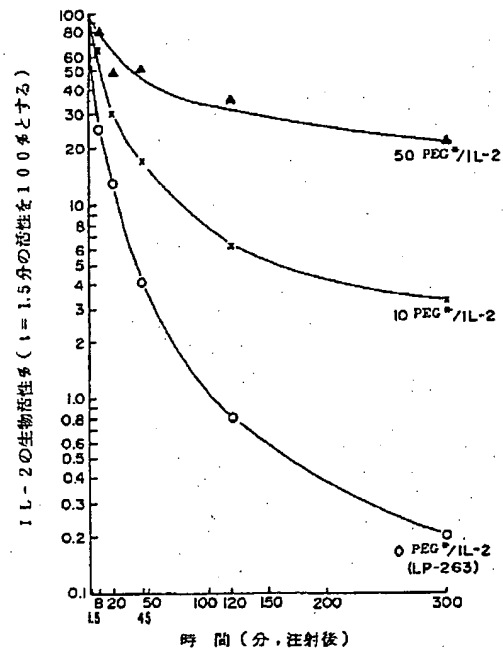




FIG. 4

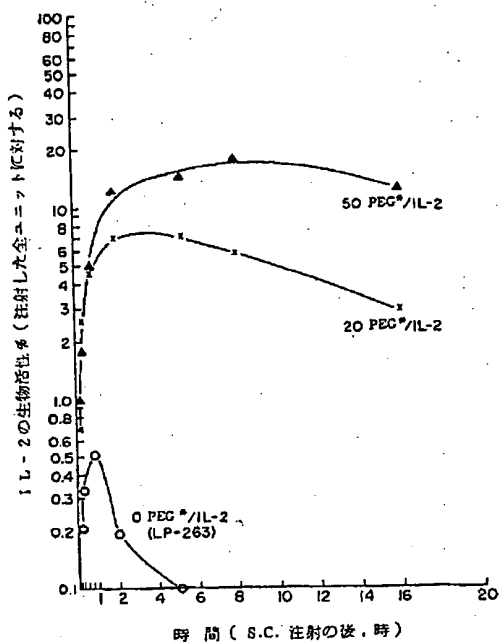


FIG. 5

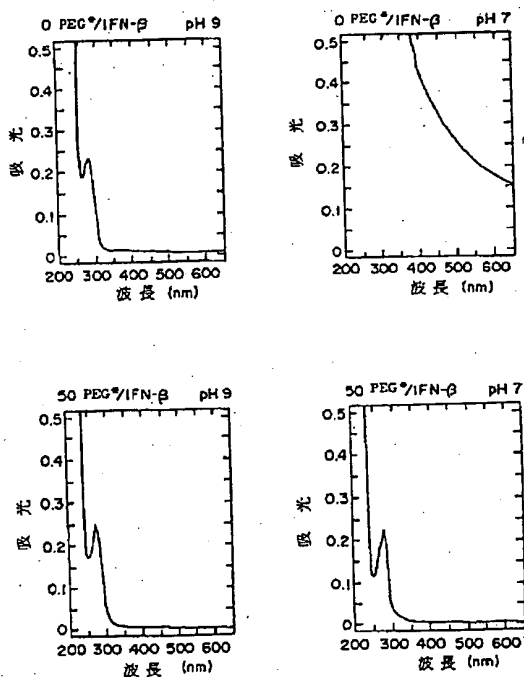
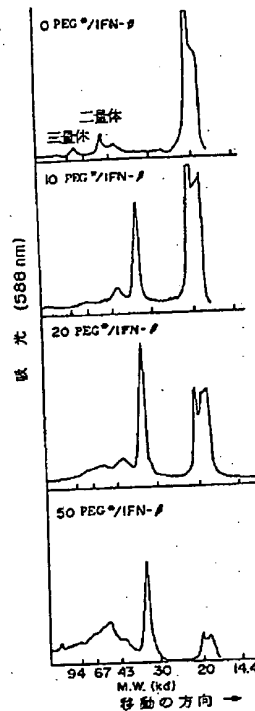


FIG. 6

## 国際調査報告

International Search Report

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) Classifications: A 61 K 47/00; A 61 K 47/02; A 61 K 37/02; A 61 K 39/395; ZPC: C 07 K 17/08	
C. WELLS DRAWINGS Circumference System: A 61 K; C 07 K	
IN DOCUMENTS REFERENCED TO BE RELEVANT P. K. EP. A. 0154316 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 11 September 1985, see the claims; page 3, lines 24-27; page 6, lines 3-11; page 9, lines 3-14 cited in the application Chemical Abstracts, Volume 101, no. 15, & October 1984 (Columbus, Ohio, US) A. Abuchowski et al.: "Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates", see page 29, Abstract 122579c, & Cancer Biochem. Biophys. 1984, 7(2), 172-86 cited in the application EP. A. 0098110 (NIXON CHEMICAL RESEARCH K.K.) 11 January 1984, see the claims cited in the application US. A. 4414147 (A.M. KLIMANOV et al.) 8 November 1983, see the claims and example 3 cited in the application	
IN CITATION Date of the Actual Completion of the International Search: 18th September 1986 Date of Mailing of the International Search Report: 23 OCT 1986 International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE Signature of the International Searching Authority: M. VAN HOL	

M. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SEARCH REPORT)	
Category	Relevance to the invention
A	US. A. 4179337 (P.F. DAVIS et al.) 18 December 1979, see the claims cited in the application
	1-10

Form PCT/ISA 01/02 (January 1979)

## ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/US 86/01252 (SA 13566)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 02/10/86.

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0154316	11/09/85	WO-A- 8503934	12/09/85
		WO-A- 8503868	12/09/85
EP-A- 0098110	11/01/84	JP-A- 58225025	27/12/83
		JP-A- 59055629	05/04/84
US-A- 4414147	08/11/83	None	
US-A- 4179337	18/12/79	DE-A- 2409770	22/01/75
		DE-A- 2431683	05/02/76
		FR-A- 2311539	07/01/77
		GB-A- 1489472	08/04/77
		CA-A- 1032673	27/08/78
		JP-A- 50542087	16/04/75
		CH-A- 616942	30/04/80
		SE-A- 7409365	11/01/75
		SE-B- 441753	04/11/95

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82